

# WO0039154

Publication Title:

## PEPTIDES OF THE AT1 RECEPTOR AND THEIR USE FOR PREECLAMPSIA AND MALIGN HYPERTENSION

Abstract:

1456 Abstract of WO0039154

The invention relates to peptides of the AT1 receptor and their use for eliminating specifically binding, cell-physiologically active, pathological antibodies in preeclampsia. The inventive peptides are further used for the diagnosis of preeclampsia. According to the invention, peptides having the sequence AFHYESQ, AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN or ENTNIT are preferred. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

---

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :  <b>C07K 7/00</b>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/39154</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Juli 2000 (06.07.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/04112		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1999 (22.12.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 60 320.7 24. Dezember 1998 (24.12.98) DE 199 54 305.4 11. November 1999 (11.11.99) DE		
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): WALLUKAT, Gerd [DE/DE]; Wolkensteinstrasse 4, D-13129 Berlin (DE). HOMUTH, Volker [DE/DE]; Pestalozzistrasse 39, D-16321 Schönow (DE). LUFT, Friedrich [DE/DE]; Karower Strasse 22, D-16341 Schwanebeck (DE).
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(73) Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: PEPTIDES OF THE AT<sub>1</sub> RECEPTOR AND THEIR USE FOR PREECLAMPSIA AND MALIGN HYPERTENSION(54) Bezeichnung: PEPTIDE DES AT<sub>1</sub>-REZEPTORS UND IHRE VERWENDUNG BEI PRÄEKLAMPSIE UND MALIGNER HYPERTONIE**(57) Abstract**

The invention relates to peptides of the AT<sub>1</sub> receptor and their use for eliminating specifically binding, cell-physiologically active, pathological antibodies in preeclampsia. The inventive peptides are further used for the diagnosis of preeclampsia. According to the invention, peptides having the sequence AFHYESQ, AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN or ENTNIT are preferred.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Peptide des AT<sub>1</sub>-Rezeptors und ihre Verwendung zur Elimination von spezifisch bindenden, zellphysiologisch aktiven, pathologischen Antikörpern bei Präekampsie sowie für ihren diagnostischen Nachweis. Bevorzugt sind Peptide mit der Sequenz AFHYESQ, AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN oder ENTNIT.

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

<b>AL</b>	Albanien	<b>ES</b>	Spanien	<b>LS</b>	Lesotho	<b>SI</b>	Slowenien
<b>AM</b>	Armenien	<b>FI</b>	Finnland	<b>LT</b>	Litauen	<b>SK</b>	Slowakei
<b>AT</b>	Österreich	<b>FR</b>	Frankreich	<b>LU</b>	Luxemburg	<b>SN</b>	Senegal
<b>AU</b>	Australien	<b>GA</b>	Gabun	<b>LV</b>	Lettland	<b>SZ</b>	Swasiland
<b>AZ</b>	Aserbaidschan	<b>GB</b>	Vereinigtes Königreich	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Tschad
<b>BA</b>	Bosnien-Herzegowina	<b>GE</b>	Georgien	<b>MD</b>	Republik Moldau	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbados	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagaskar	<b>TJ</b>	Tadschikistan
<b>BE</b>	Belgien	<b>GN</b>	Guinea	<b>MK</b>	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	<b>TM</b>	Turkmenistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Griechenland	<b>ML</b>	Mali	<b>TR</b>	Türkei
<b>BG</b>	Bulgarien	<b>HU</b>	Ungarn	<b>MN</b>	Mongolei	<b>TT</b>	Trinidad und Tobago
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Irland	<b>MR</b>	Mauretanien	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brasilien	<b>IL</b>	Israel	<b>MW</b>	Malawi	<b>UG</b>	Uganda
<b>BY</b>	Belarus	<b>IS</b>	Island	<b>MX</b>	Mexiko	<b>US</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>CA</b>	Kanada	<b>IT</b>	Italien	<b>NE</b>	Niger	<b>UZ</b>	Usbekistan
<b>CF</b>	Zentralafrikanische Republik	<b>JP</b>	Japan	<b>NL</b>	Niederlande	<b>VN</b>	Vietnam
<b>CG</b>	Kongo	<b>KE</b>	Kenia	<b>NO</b>	Norwegen	<b>YU</b>	Jugoslawien
<b>CH</b>	Schweiz	<b>KG</b>	Kirgisistan	<b>NZ</b>	Neuseeland	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KP</b>	Demokratische Volksrepublik	<b>PL</b>	Polen		
<b>CM</b>	Kamerun	<b>KR</b>	Republik Korea	<b>PT</b>	Portugal		
<b>CN</b>	China	<b>KZ</b>	Kasachstan	<b>RO</b>	Rumänien		
<b>CU</b>	Kuba	<b>LC</b>	St. Lucia	<b>RU</b>	Russische Föderation		
<b>CZ</b>	Tschechische Republik	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SD</b>	Sudan		
<b>DE</b>	Deutschland	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SE</b>	Schweden		
<b>DK</b>	Dänemark	<b>LR</b>	Liberia	<b>SG</b>	Singapur		
<b>EE</b>	Estland						

## Peptide des AT<sub>1</sub>-Rezeptors und ihre Verwendung bei Präeklampsie und maligner Hypertonie

Die Erfindung betrifft Peptide des AT<sub>1</sub>-Rezeptors und deren Verwendung und ihrer Folgeprodukte in antigenen und immunogenen Mitteln bzw. Testkits, insbesondere zur Elimination von spezifisch bindenden, zellphysiologisch aktiven, pathologischen Antikörpern bei Präeklampsie sowie für ihren diagnostischen Nachweis. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten.

Das Immunsystem ist ein essentieller Bestandteil bei allen tierischen Lebewesen. Bei den Säugetieren dient es insbesondere zur Abwehr von Mikroorganismen, zur Geweberegeneration und zur Vernichtung von Tumorzellen. In der klassischen Immunologie wird unterschieden zwischen einer zellulären und einer humoralen Immunabwehr. Darunter versteht man zwei unterscheidbare, aber miteinander kooperierende Systeme, die letztlich das Immunsystem darstellen.

Es existieren eine Reihe von Krankheiten, die als Autoimmunerkrankungen bezeichnet werden. Bei solchen Krankheiten richtet sich das Immunsystem bei den Betroffenen gegen sich selbst. Zu den vorwiegend zellvermittelten Autoimmunerkrankungen gehören Multiple Sklerose und Diabetes Typ I. Eine zweite Gruppe machen die antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen aus. Zu ihnen zählt beispielsweise Rheuma oder auch die seltener vorkommenden Autoimmunerkrankungen wie Myasthenia gravis oder Lupus erythematoses.

Die Pathogenese der meisten Autoimmunerkrankungen ist unbekannt. Es gibt verschiedene Hypothesen und Modelle, wie man die Entstehung von Autoimmunerkrankungen erklären kann. Ein Erklärungsmodell stellt beispielsweise das antigene/molekulare Mimikry dar. Hierbei geht man davon aus, daß Mikroorganismen, z. B. Viren oder Parasiten sich mit bestimmten Molekülen ausstatten, die vom wirtseigenen Immunsystem nicht erkannt werden und es unterlaufen. Werden sie allerdings als fremd erkannt und gegen sie Antikörper induziert und produziert, erkennen diese Antikörper ähnliche körpereigene Strukturen.

Es gehört zum Wesen von Autoimmunerkrankungen bzw. Autoantikörpern, daß sie an körpereigene Zellen und Gewebe binden. Hierbei kann entweder das zelluläre Immunsystem und das Komplementsystem aktiviert werden, welches dann vor Ort

pathogene Reaktionen im Gewebe – z. B. chronische Entzündungen – auslöst oder aber es kommt zu einer pathologischen Fehlfunktion der Zellen, an denen die Autoantikörper gebunden haben.

Als ein klassisches Beispiel hierfür kann die Dilatative Cardiomyopathie gelten. Bei dieser Autoimmunerkrankung bildet der Organismus fehlerhaft Autoantikörper, die an ein definiertes Epitop des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors binden. Diese Autoantikörper erzeugen in biologischen Tests an Ratten-Cardiomyozyten in der Zellkultur (Diese Zellen haben einen nahezu identischen  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor auf der Oberfläche) eine Erhöhung der Pulsationsrate. Man spricht hier von einer pharmakoaktiven, dem Adrenalin ähnlichen Wirkung, der Autoantikörper.

Die Dilatative Cardiomyopathie ist eine Autoimmunerkrankung, die unbehandelt zu einer starken Beeinträchtigung der Herzleistung durch Reduktion der Pumpleistung bei gleichzeitiger Ausdehnung des Herzmuskelgewebes durch Infiltrate führt. Werden allerdings in den Vorstufen der Erkrankung dem Patienten durch eine Blutwäsche die Antikörper aus dem Blut entfernt, kommt es im Laufe eines Jahres zu einer Regeneration des Herzmuskel und zu einer drastischen Verbesserung der Herzmuskelleistung, die beinahe wieder die Werte von gesunden Personen erreicht.

Offensichtlich kann also durch die Elimination der pathologischen Antikörper aus dem Blutkreislauf – und nichts anderes geschieht bei der Entfernung der Gesamtimmunglobuline – die Regeneration des Herzmuskel eingeleitet werden.

Ähnlich ist die Situation bei der Präeklampsie.

Die Präeklampsie ist eine schwangerschaftsspezifische Hochdruckform und zählt zu den wichtigsten Ursachen von mütterlichen Todesfällen während der Schwangerschaft und unter der Geburt. Eine noch größere Bedeutung hat die Präeklampsie für das Schicksal der Frucht, das heißt sie ist verantwortlich für Frühgeburtlichkeit, Wachstumsretardierung und perinatale Sterblichkeit.

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Erkenntnisse gewonnen wurden, sind die Ursachen dieses Krankheitsbildes weiterhin nicht geklärt. Die einzige kausale Therapie ist die vorzeitige Beendigung der Schwangerschaft. Dies ist jedoch bei frühem Auftreten der Krankheitssymptome, das heißt insbesondere vor der 20. Schwangerschaftswoche, kaum mit dem gesunden Überleben des Kindes vereinbar. Auf der anderen Seite kann jeder Tag der Verlängerung einer Schwangerschaft in

dieser kritischen Zeitspanne die kindlichen Überlebenschancen verbessern. Beste Voraussetzungen, dieses Ziel zu erreichen, bieten eine frühzeitige Erkennung (Diagnose) der Entwicklung einer Präeklampsie und darauf aufbauende Überwachungs- und Behandlungsverfahren (Immunglobulinadsorption)

Die Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, Substanzen zu finden, die bei Präeklampsie und maligner Hypertonie den Nachweis von pathologischen Antikörpern zu ermöglichen und dafür entsprechende Systeme bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe besteht darin, die Elimination solcher Antikörper aus dem Blut zu ermöglichen.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Die Erfindung beruht auf dem erstmaligen Nachweis, daß Patientinnen mit Präeklampsie spezifische Antikörper gegen blutdruckwirksame Angiotensin-AT<sub>1</sub>-Rezeptoren aufweisen. Bei Frauen mit normaler Schwangerschaft traten diese Antikörper nicht auf, ebenso nicht bei Schwangeren mit einer chronischen Hypertonie, das heißt einer schwangerschaftsunabhängigen Hypertonie. Die beobachteten Angiotensin-II-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper führen zu einer Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, die wahrscheinlich mitverantwortlich ist für gefährdende Blutdruckerhöhungen und eine akute Durchblutungsverschlechterung lebenswichtiger mütterlicher und kindlicher Organe.

Bei Patientinnen mit dieser Erkrankung läßt sich aus dem Plasma eine Immunglobulinfraktion isolieren, welche Autoantikörper enthält, die an den Angiotensin-1 Rezeptor binden und darüber die Zelle aktivieren. Fügt man - in vitro - dem Zellkultursystem Peptide des AT1-Rezeptors hinzu, welche die Bindungsstelle für die Antikörper darstellen, läßt sich der pathologische Effekt der Autoantikörper aufheben. Ähnliches ist möglich durch die Verwendung funktionsanaloger Peptide, vorzugsweise mit der Aminosäuresequenz AFHYESQ, AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN oder ENTNIT.

Überraschend ist, daß dieselben Epitopstrukturen, wenn sie an eine Festphase gebunden sind, aus dem Blutplasma von den Patientinnen die Antikörper eliminieren, die für den pathologischen Effekt zuständig sind.

Ein wesentlicher Teil der Erfindung ist damit die Bereitstellung von Aminosäuresequenzen in Form von Peptiden, die pathologische Autoantikörper aus dem Plasma von Patientinnen mit Präeklampsie erkennen, binden und eliminieren.

Serumproben von Patienten mit Präeklampsie enthalten Autoantikörper, die gegen den Angiotensin-II-AT<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp gerichtet sind. In einem Bioassay entfalten diese Antikörper einen positiv chronotropen Effekt. Dieser Effekt wird wie der des Angiotensin II durch den subtypselektiven AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker Losastan unterbunden. Alpha- und beta-adrenergische Antagonisten und der AT<sub>2</sub>-Rezeptorblocker PD 123319 waren ohne Einfluß.

Es wurde überraschend festgestellt, daß die Antikörper ein Epitop auf der zweiten extrazellulären Schleife des AT<sub>1</sub>-Rezeptors erkennen und daß sie mit Hilfe von Peptiden, die dieser Schleife entsprechen, neutralisiert bzw. affinitätschromatographisch gereinigt werden können. Das Epitop ist durch die Aminosäuresequenz AFHYESQ charakterisiert. Ferner gehören auch funktionsanaloge Peptide mit der Aminosäuresequenz AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN oder ENTNIT zum Umfang der Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind somit Peptide, die das die physiologisch aktiven Autoantikörper bindende Epitop des AT<sub>1</sub>-Rezeptors enthalten, vorzugsweise bestehend aus 5 bis 10 Aminosäuren sowie ihre Varianten, die ein Epitop bilden und Autoantikörper binden können, die bei Präeklampsie vorkommen.

Bevorzugt sind Peptide, die ganz oder teilweise die SEQ ID Nr. 1 AFHYESQ enthalten.

Die Peptide werden nach an sich bekannten Verfahren durch Aufbau der Aminosäuren synthetisiert oder gentechnisch hergestellt.

Erfindungsgemäße Antikörper, die gegen das Epitop des AT<sub>1</sub>-Rezeptors gerichtet sind, sind dadurch gekennzeichnet, daß sie diese Peptide erkennen. Bevorzugt erkennen sie das Peptid der SEQ ID Nr. 1 bzw. seine Varianten. Weitere Antikörper erkennen die Peptide mit der Aminosäuresequenz AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN oder ENTNIT. Sie werden nach an sich bekannten Verfahren durch Immunisierung von Kleinsäugern oder Immunisierung von Milzzellen in vitro mit den erfindungsgemäßen Peptiden hergestellt.

Anwendung finden die Antikörper in verschiedenen Bio-Assays, immunologischen Nachweissystemen und ELISA-Testsystemen.

Weiterhin betrifft die Erfindung antigenen Mittel zum Nachweis von Präeklampsie, die mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid vorzugsweise das Peptid der SEQ ID Nr. 1 bzw. auch Peptide mit der Aminosäuresequenz AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN oder ENTNIT, enthalten. Sie reagieren mit den bei Präeklampsie vorkommenden spezifischen Antikörpern gegen blutdruckwirksame Angiotensin-AT<sub>1</sub>-Rezeptoren. Ggf. sind die antigenen Mittel an verschiedene Träger gebunden, wie z.B. aktivierte Sepharosen, Zellulosen oder Polystyrolträger.

Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide besteht in immunogenen Mitteln. Diese enthalten mindestens ein Peptid, vorzugsweise das Peptid der SEQ ID Nr. 1 bzw. auch Peptide mit der Aminosäuresequenz AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN oder ENTNIT, die die Produktion von Antikörpern, die fähig sind, Autoantigene bei Präeklampsie zu erkennen, induzieren.

Außerdem wird durch die Erfindung eine Testkit zur Bestimmung von Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern zum Nachweis von Präeklampsie bereitgestellt.

#### Der Testkit umfaßt

- mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid ggf. an eine feste Phase gebunden
- einen Puffer
- ein spezifisches Konjugat nebst Enzym
- eine Waschlösung
- die Substratlösung zum Nachweis der Enzymreaktion
- und eine Stopplösung

#### Der Bio-Assay umfaßt

- spontan pulsierende neonatale Kardiomyozyten in Primärkultur oder
- aus undifferenzierten embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten
- in einem Kulturmedium

Durch Entwicklung des neuen Testkits auf der Basis der erfindungsgemäßen Peptide lassen sich der Nachweis von Präeklampsie und Verlaufsbeurteilungen einfach und schnell durchführen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Nachweis von Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten. Die zu untersuchende Probe wird mit mindestens einem erfindungsgemäßen Peptid oder mit einer Verbindung dieser Peptide mit einem Trägermaterial unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion zulassen. Der Nachweis wird anschließend mittels an sich bekannter chemischer oder physikalischer Methoden durchgeführt.

Die Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper konnten in allen bisher untersuchten Seren von Patienten mit Präeklampsie nachgewiesen werden. Die Antikörper erscheinen nach der 20. Schwangerschaftswoche und verschwinden nach der Entbindung relativ schnell. Die Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper wurden nicht bei normalen Schwangerschaften bzw. bei schwangeren Hypertonikerinnen nachgewiesen.

Da sich die Antikörper in in vitro Tests wie der Agonist Angiotensin II verhalten, kommt diesen Antikörpern eine Rolle in der Pathogenese oder Präeklampsie zu. Da sie in allen untersuchten Präeklampsieseren nachweisbar sind, sind sie als diagnostische Marker von Bedeutung.

Als Bioassay wurden kultivierte neonatale Rattenherzzellen eingesetzt. Diese Zellen entwickeln eine rhythmische spontane Pulsation und reagieren auf eine Angiotensin-II-Stimulierung mit einer Steigerung der Schlagfrequenz.

Der Nachweis dieser AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper dient erfindungsgemäß sowohl der Früherkennung einer Präeklampsie als auch als Grundlage für neuartige Therapieverfahren.

Gegenstand der Erfindung sind somit auch therapeutische Mittel gegen Präeklampsie, die diese Peptide enthalten, da die Entfernung der Angiotensin-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper aus dem mütterlichen Blut (zum Beispiel mittels spezifischer oder unspezifischer Immunadsorption) zu einer Besserung des klinischen Bildes führt oder zumindest eine Progredienz verhindern kann, was mit einer Verminderung der mütterlichen Gefährdung und insbesondere mit einer deutlichen Verbesserung der kindlichen Überlebenschancen verbunden ist.

Die spezifische Immunglobulinadsorption wird durchgeführt an einer Säule, an der sich Peptide befinden, in denen mindestens die Antikörper-bindende Sequenz AFHYESQ enthalten ist (die bevorzugt die zweite extrazelluläre Schleife des AT<sub>1</sub>-Rezeptors bzw. die Sequenz ID Nr. 1 enthält).

Die unspezifische Immunglobulinadsorption wird durchgeführt an einer Säule, die bevorzugt Schafs- bzw. Hühnerantikörper gegen die humanen Immunglobuline bzw. Protein A oder C1<sub>q</sub> enthält.

Mit diesem Adsorber werden alle Ig des Blutplasmas, so auch die gegen den AT<sub>1</sub>-Rezeptor gerichteten Autoantikörper, gebunden und eliminiert unter Verwendung einer geeigneten und dem Fachmann bekannten Apparatur.

Die am Beispiel der Präeklampsie beschriebene Erfindung ist gleichermaßen anwendbar für einige Fälle der malignen Hypertonie, bei denen ein Autoantikörper gefunden wird, der dasselbe Epitop (dieselbe Sequenz) erkennt.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Abb. 1:

Wirkung der Loops I – III des AT<sub>1</sub>-Rezeptors auf die zellkontrahierende Aktivität der Autoantikörper (enthalten in der aus dem Serum von Präeklampsiepatientinnen isolierten  $\gamma$ -Globulinfraktion)

Die  $\gamma$ -Globulinfraktion an dem Serum von Präeklampsiepatientinnen erhöht die Schlagfrequenz der Herzmuskelzellen um 22 ± x Schläge pro Minute (fiktiv). Werden die  $\gamma$ -Globulinfraktionen mit Peptiden, die diese Loops I – III entsprechenden Teile des AT<sub>1</sub>-Rezeptors darstellen, vorinkubiert, und anschließend die Antikörper dem Zell-Testsystem zugesetzt, hemmen die Loop II-Peptide die Antikörper-Wirkung auf die Zellen.

Abb. 2:

Epitopanalyse von Loop II des AT<sub>1</sub>-Rezeptors - Wirkung von Aminosäuresequenzen aus Loop II auf die Autoantikörper-vermittelten Zellstimulationen

Die  $\gamma$ -Globulinfraktion an dem Serum von Präeklampsiepatientinnen erhöht die Schlagfrequenz der Herzmuskelzellen. Die Aminosäuresequenz AFHYESQ aus Loop II inhibiert die Wirkung der Autoantikörper, nicht hingegen die Sequenzbereiche aus anderen Teilen vom Loop II.

### 3. Bioassay zum Nachweis der Antikörper

Zur Identifizierung und Charakterisierung der AT<sub>1</sub>-Rezeptor Antikörper wurde ein sensitiver Bioassay eingesetzt. Es wurden spontan pulsierende Herzmyozyten genutzt, die auf eine Angiotensin II Stimulierung mit einer Steigerung der Schlagfrequenz reagierten. Dieser positiv chronotrope Effekt wurde durch den selektiven Antagonisten Losartan geblockt. Die Inkubation dieser Zellen mit dem Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor Autoantikörper führte ebenfalls zu einer Steigerung der Pulsationsrate, die durch Losartan unterbunden wurde. Des weiteren konnte dieser agonistische Effekt durch ein Peptid, das der zweiten extrazellulären Schleife des AT<sub>1</sub>-Rezeptors entsprach neutralisiert werden.

Um auf der zweiten extrazellulären Schleife des Angiotensin II AT<sub>1</sub>-Rezeptors die Epitope der Autoantikörper zu identifizieren, wurde versucht mit kurzen sich überlappenden Peptiden die Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor Autoantikörper zu neutralisieren. Es zeigte sich, dass auf dieser extrazellulären Schleife des AT<sub>1</sub>-Rezeptors von Hypertonikern zwei Epitope existieren, die in der Lage waren, die Wirkung des Antikörpers aufzuheben. Es handelte sich um die Epitope ENTNIT und AFHYESQ. Bei Präeklampsiepatienten wurde der über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor realisierte agonistische Effekt der Antikörper nur durch das Peptid AFHYESQ neutralisiert. Dieses Epitop besitzt bei dieser Erkrankung eine besondere Bedeutung, da es bei allen untersuchten Patientinnen identifiziert wurde. Die funktionsanalogen Peptide SHFYQTR und GYYFDTN waren ebenfalls in der Lage die Antikörper zu neutralisieren Tab.I.

Tab.I Patientenantikörper vorbehandelt mit Peptid

Patient Nr.	Antikörper 1:40	+	Peptid AFHYESQ	Peptid SHFYQTR	Peptid GYYFDTN
1	19,6±1,90		1,2±0,84	0,8±1,16	2,4±0,72
2	20,0±1,90		1,6±1,24	0,8±0,80	2,8±1,20

**Patentansprüche**

1. Peptide des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, vorzugsweise bestehend aus 5 bis 30, vorzugsweise 5 bis 10 Aminosäuren sowie ihre Varianten, die ein Epitop bilden und Autoantikörper binden können, die bei Präeklampsie und maligner Hypertonie vorkommen.
2. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ganz oder teilweise oder als Variante der SEQ ID Nr. 1 AFHYESQ aufgebaut sind.
3. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ganz oder teilweise oder als Variante der funktionsanalogen Peptide mit der Aminosäuresequenz AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN oder ENTNIT aufgebaut sind.
4. Antikörper, die gegen das Epitop des AT<sub>1</sub>-Rezeptors gerichtet sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Peptide gemäß Anspruch 1 bis 3 erkennen.
5. Antikörper nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Peptide der SEQ ID Nr. 1 bzw. funktionsanaloge Peptide mit der Aminosäuresequenz AVHYQSN, SHFYQTR, GYYFDTN oder ENTNIT bzw. ihre Varianten erkennen.
6. Verwendung des ganzen humanen AT<sub>1</sub>-Rezeptors oder Teilen davon, mindestens enthaltend die Aminosäuresequenz AFHYESQ oder Teilen davon oder von funktionsanalogen Peptiden zur Bindung pathologischer, funktionell aktiver Autoantikörper, zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken bei Krankheiten mit positivem Antikörperstatus, insbesondere der Präeklampsie.
7. Verwendung nach Anspruch 6. dadurch gekennzeichnet, daß Autoantikörperbindende Varianten sowie funktionsanaloge Peptide von AFHYESQ benutzt werden.
8. Verwendung nach Anspruch 6 und 7. dadurch gekennzeichnet, daß rekombinant hergestellte Autoantikörperbindende Rezeptorteile des AT<sub>1</sub>-Rezeptors sowie funktionsanaloge Peptide verwendet werden.
9. Verwendung nach Anspruch 6 bis 8. dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuresequenz AFHYESQ sowie funktionsanaloge Peptide oder Varianten davon enthaltende Moleküle löslich oder festphasengebunden zum direkten oder

indirekten (kompetitiven) Antikörpernachweis in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut verwendet werden.

10. Verwendung nach Anspruch 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuresequenz AFHYESQ sowie funktionsanaloge Peptide oder Varianten davon enthaltende Moleküle festphasengebunden zur Bindung und Elimination der pathologischen, funktionell aktiven Autoantikörper in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, also zur Immunglobulinadsorption verwendet werden.
11. Verwendung nach Anspruch 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuresequenz AFHYESQ sowie funktionsanaloge Peptide oder Varianten davon enthaltende Moleküle festphasengebunden zur Bindung und Elimination der pathologischen, funktionell aktiven Autoantikörper in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, also zur Immunglobulinadsorption verwendet werden.
12. Verwendung nach Anspruch 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuresequenz AFHYESQ sowie funktionsanaloge Peptide oder Varianten davon enthaltende Moleküle festphasengebunden zur Bindung und Elimination der pathologischen, funktionell aktiven Autoantikörper in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, also zur Immunglobulinadsorption in Kombination mit unspezifischer (Gesamtimmungloblin-bindenden Liganden) verwendet werden.
13. Bindung und Elimination der pathologischen, funktionell aktiven Autoantikörper in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, durch Verwendung unspezifischer Adsorbermoleküle wie Protein A, Protein G, anti-human-Immunglobuline sowie Gesamt-immungloblin-bindende Liganden wie Aminosäuren, insbesondere L-Tryptophan oder Peptide.
14. Verwendung von Peptiden, mindestens enthaltend die Aminosäuresequenz AFHYESQ sowie funktionsanaloge Peptide zur Immunisierung von Säugetieren zum Zwecke der Gewinnung poly- und monoklonaler Antikörper.
15. Verwendung von Antikörpern, die gegen die Aminosäuresequenz AFHYESQ und funktionsanaloge Peptide gerichtet sind, zur Immunisierung von Säugetieren zum Zwecke der Gewinnung antiidiotypischer Antikörper.
16. Antigenes Mittel zum Nachweis von Präeklampsie bzw. der malignen Hypertonie, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Peptid gemäß der Ansprüche 1

bis 3, vorzugsweise der SEQ ID Nr. 1, enthält.

17. Immunogenes Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Peptid gemäß der Ansprüche 1 bis 3, vorzugsweise der SEQ ID Nr. 1, enthält, das die Produktion von Antikörpern, die fähig sind, Autoantigene bei Präeklampsie oder maligner Hypertonie zu erkennen, induziert.
18. Testkit zur Bestimmung von Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern zum Nachweis von Präeklampsie oder maligner Hypertonie, enthaltend mindestens ein Peptid gemäß Anspruch 1 bis 3.
19. Verfahren zum Nachweis von Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß man die zu untersuchende Probe mit mindestens einem Peptid der Ansprüche 1 bis 3 in Kontakt bringt oder einer Verbindung dieser Peptide mit einem Trägermaterial unter solchen Bedingungen, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion zulassen und den Nachweis mittels an sich bekannter chemischer oder physikalischer Methoden führt.
20. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung therapeutischer Mittel gegen Präeklampsie oder maligne Hypertonie.

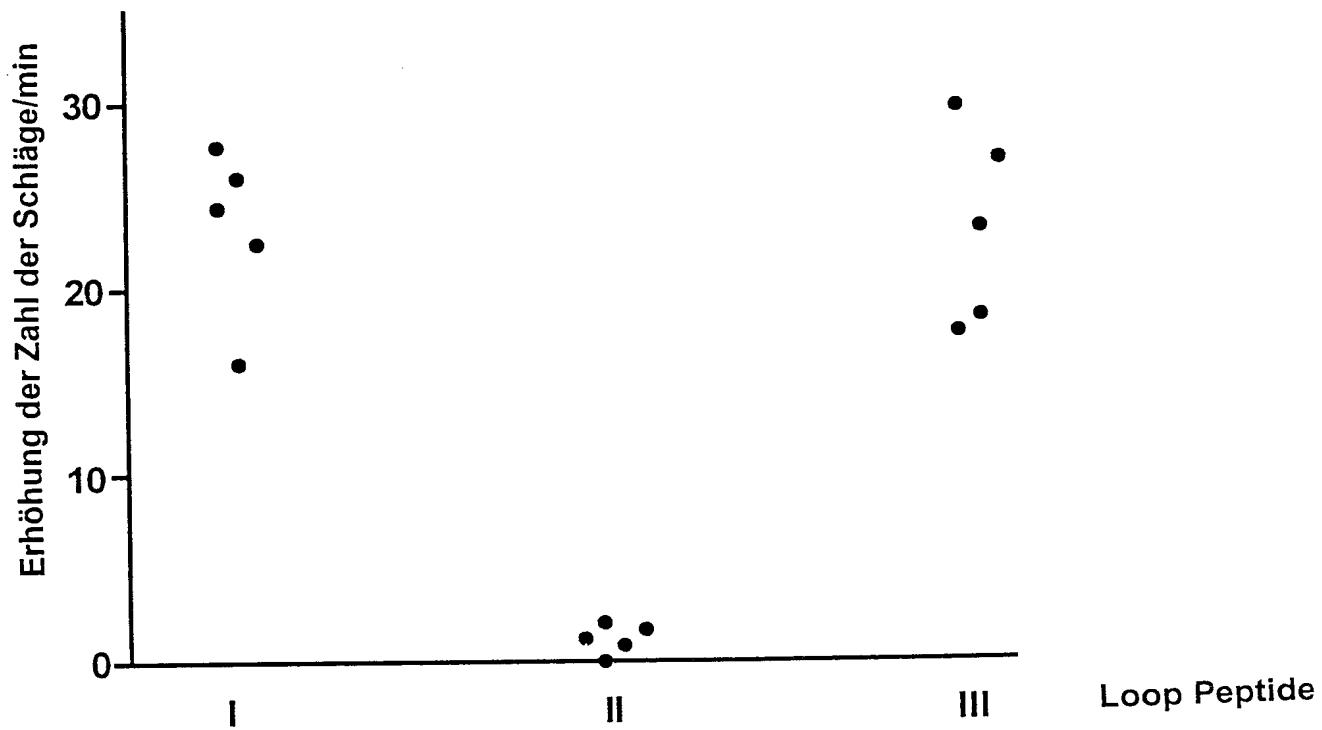


Abb. 1

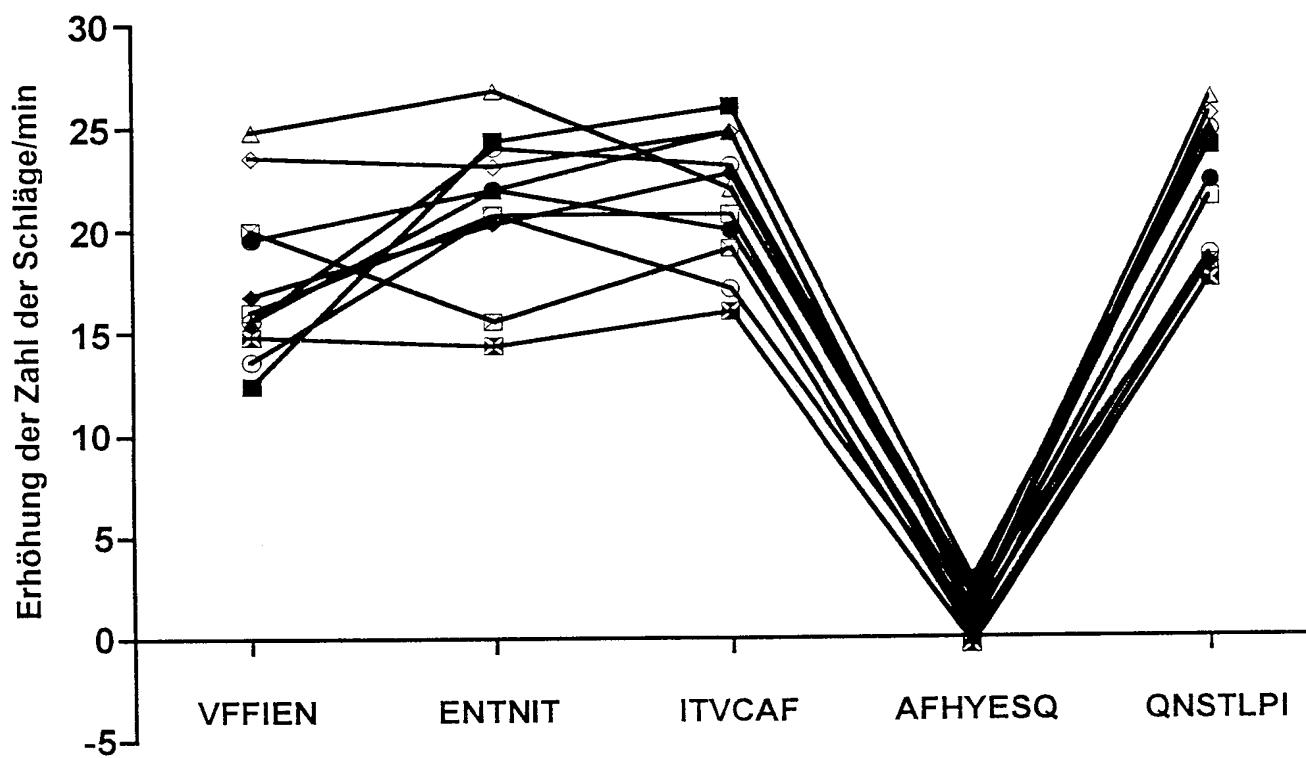


Abb. 2